Istituto di Patologia generale della Università di Ferrara

Prof. C. SACERDOTTI

S
129

SULLA PRODUZIONE DAGLI ERITROCITI

DI

SOSTANZE CAPACI DI SATURARE

LE EMOLISINE

Comunicazione fatta all'Accademia delle Scienze Mediche e Naturali di Ferrara
nella Seduta 19 Maggio 1905

FERRARA
STAB. TIP. DITTA G. BRESCIANI. SUCC.
1905

Istituto di Patologia generale della Università di Ferrara

Prof. C. SACERDOTTI

SULLA PRODUZIONE DAGLI ERITROCITI

DI

SOSTANZE CAPACI DI SATURARE

LE EMOLISINE

FERRARA
STAB. TIP. DITTA G. BRESCIANI, SUCC.
1905

In base alla teoria di Ehrlich delle catene laterali, si ammette che le cellule sia dei batteri sia dei tessuti nei fenomeni della immunità vengano attaccate e quindi distrutte dai liquidi organici (sangue) in quanto contengono dei gruppi molecolari capaci di combinarsi con gruppi molecolari delle sostanze che le attaccano. A tali gruppi molecolari è stato dato il nome di recettori. E come gli elementi estranei allo organismo vengono attaccati per mezzo dei loro recettori, così è pure per mezzo dei propri recettori che le cellule dell'organismo sono attaccate dalle tossine batteriche e da altri veleni di origine vegetale od animale. Alla stessa guisa che si ammette che nell'organismo i recettori staccatisi dalle corrispondenti cellule, nel fenomeno della immunità, possano saturare una tossina (secondo Ehrlich le antitossine sarebbero le catene laterali o i recettori liberi, cioè staccati dalle relative cellule) così è logico supporre che, ottenuti recettori liberi da batteri o da altre cellule estranee all'organismo, questi siano in grado di saturare le agglutinine e le lisine esistenti nei sieri che si dimostrano attivi contro i corrispondenti elementi. E, come i batteri e le cellule sono in grado di eccitare, introdotte in un organismo in opportune quantità, degli stati immunitari, analogamente dovrebbero comportarsi i recettori liberi, rappresentando questi la parte veramente attiva nei fenomeni di vaccinazione.

Per i batteri questi presupposti teorici hanno ricevute conferma da risultati sperimentali. Infatti, Neisser e Shiga (1) ottennero dei recettori liberi da bacilli del tifo, sospendendo la patina di una cultura su agar in 10 cmc. di soluzione fisiologica e tenendo la sospensione, dopo averne uccisi i germi

(1) Deut. Med. Woch. 1903 N. 4

col riscaldamento a 60°, per due giorni a 37° e quindi filtrando per candela di Reichel. La dimostrazione che in questo filtrato si trovano recettori liberi è ottenuta da prima dal fatto che questo liquido, messo a contatto di un siero antitifico fortemente agglutinante, è capace di fissare l'agglutinina. Di più, conformemente alle previsioni teoriche, l'iniezione di questo filtrato ad animali determina la produzione di siero molto agglutinante e di forte potere battericida. Risultati analoghi ottennero anche con colture di b. della dissenteria. E preconizzarono l'uso dei recettori liberi anche per immunizzare l'uomo contro alcune infezioni. Tentativi sperimentali in proposito furono poi fatti da Shiga (1) per il b. del tifo e da Bertarelli (2) per quello del colera.

Sebbene il processo della emolisi sia stato molto ampiamente studiato, appunto per gli stretti rapporti che presenta col processo dell'immunità antibatterica, pure non esistono ricerche così probative relativamente ai recettori degli eritrociti.

Nolf (3) ammette che la sostanza che determina la comparsa delle emolisine in seguito ad iniezioni di sangue eterogeneo sia contenuta nei globuli rossi, avvicinandosi così ai concetti precedentemente svolti da v. Dungern (4), e ritiene che l'iniezione di siero da solo determini la produzione di precipitine, la iniezione degli stromi dei globuli rossi determini la comparsa di agglutinine, l'iniezione del contenuto globulare, liberato dagli stromi, la comparsa di sole emolisine. Più tardi A. Leblanc (5), in un lavoro sulla immunità acquisita, a proposito di ricerche rivolte allo scopo di ottenere sieri specifici contro albuminoidi del sangue isolati, coordinando alcuni risultati di queste sue ricerche con quelli di Nolf, enuncia il sospetto che la sostanza determinante la comparsa del corpo immune nelle emolisi artificiale sia la emoglobina. E dopo poco, in un lavoro che con questo ha rapporti molto intimi, M. Ide (6) studiando il siero antiemoglobinico crede di poter nettamente affermare che il recettore del globulo rosso

(1) Berl. Klin. Woch. 1904 N. 4
(2. Deut. Med. Woch 1904 N. 33 e Lo Sperimentale, 1905 f.ª 2
(3) Annales de l'Inst. Pasteur 1900 p. 297
(4) Muenchener Med. Woch. 1899 N. 13-14
(5) La Cellule, 1901 tome 18° f. 2
(6) La Cellule, 1903 tome 20° f. 2

non sia altro che l'emoglobina. Egli crede di poter affermare ciò perchè per ottenere il suo siero antiemoglobinico si è servito di emoglobina preparata con i mezzi migliori che la scienza suggerisce per averla pura, e questo siero antiemoglobinico era anche fortemente emolitico. Alle ricerche di Nolf non mancarono delle critiche ed anche recentemente è comparso un lavoro di Ford e Harsley (1) che arriva alla conclusione che tanto gli stromi quanto il liquido ottenuto col laccaggio del sangue, iniettati negli animali, determinano la produzione simultanea di agglutinine e di lisine. E le conclusioni così recise di Ide circa il significato di recettore che si dovrebbe attribuire alla emoglobina, non si possono accettare senza discussione, poi che egli stesso, circa la purezza della emoglobina iniettata si esprime testualmente così: « certes, nous admettons que l' hémoglobine que nous injectons contient des traces d' autres albumines contenues également dans l'érytrocyte, et peut-être même des inconnues non protéiques... »; e non si sa nulla di preciso sulla natura chimica dei recettori e nulla ci autorizza a ritenere che per ottenere fenomeni immunitari siano necessarie cospicue quantità di tali gruppi molecolari.

Stando la questione in questi termini, mi parve che potesse avere un qualche interesse istituire ricerche intorno alla possibilità di ottenere anche dai globuli rossi delle sostanze che abbiano proprietà analoghe a quelle cui Neisser e Siga attribuirono il significato di recettori liberi in istato di relativa purezza. Senza voler per ora investigare la natura chimica di tali sostanze, non essendo, mi sembra, le nostre cognizioni sulla costituzione chimica delle cellule tali da permetterci di affrontare uno studio così delicato; ed ancora senza voler dimostrare in modo perentorio che queste sostanze siano realmente da considerarsi i veri ed unici recettori.

Ho cominciato col voler vedere come si comportassero di fronte a determinati sieri emolitici le sospensioni di eritrociti in soluzione fisiologica allestite di recente e quelle invece preparate da parecchio tempo, conservate in condizioni di asepsi perfetta.

(1) Journ. of. med. Rasearch, 1904, N. XI

Ho visto subito che, mentre, come è noto da parecchio tempo, gli eritrociti conservati *in vitro* perdono gradatamente della loro resistenza di fronte alle soluzioni ipotoniche (sì che nelle emulsioni di parecchi giorni si aveva la dissoluzione completa con l'aggiunta di molto minore quantità di acqua distillata che nelle emulsioni recenti) di fronte ai sieri emolitici presentavano invece molto maggiore resistenza le miscele vecchie che le recenti, (1). Queste prime ricerche erano fatte su miscele rimaste sempre a temperatura dell'ambiente (15°-20°) e agendo su sangue di bue con siero di coniglio immunizzato per detto sangue. In una di queste prove ho, per esempio, constatato che, mentre per emulsioni fresche si aveva emolisi completa facendo agire cmc. 0.20 di siero su 1 cmc. di sospensione globulare, lo stesso risultato per le emulsioni vecchie non si aveva che con cmc. 0.60 di siero.

Per interpretare queste risultato si possono fare tre ipotesi: o i globuli rimasti per un certo tempo in soluzione fisiologica aumentano la loro resistenza per le emolisine, o nella soluzione si formano sostanze protettive, pur rimanendo uguale la resistenza dei globuli alla azione emolitica, o i globuli, cedendo al liquido i loro gruppi aptofori (recettori), impartono a questo la proprietà di legare le emolisine ed essi perdono la loro recettività per l'emolisine.

Ho quindi eseguito una serie di ricerche per chiarire quale delle ipotesi fosse la più accettabile. A questo scopo ho fatto agire una determinata quantità di siero attivo su 4 sospensioni diverse di globuli rossi, eseguite tutte colla massima cura in modo da accertarmi che ognuna nell'unità di volume contenesse con molta approssimazione la stessa quantità di globuli: la prima era allestita al momento con sangue fresco e soluzione indifferente nuova; la seconda era stata allestita dodici giorni prima; la terza con globuli di questa avuti per centrifugazione lavati in Na Cl. 0.85 °/₀ e risospesi in liquido indiffe-

(1) In tutte le esperienze che cito in questa nota ho sempre agito con globuli rossi sospesi in soluzione di N.a Cl al 0,85 °/₀ e la sospensione era fatta nella proporzione del 5 °/₀. Il contatto del sangue col siero è sempre stato di 2 ore a 37° C., avendo cura di agitare le provette circa ogni 20 minuti.

rente nuovo; la quarta con globuli freschi sospesi in liquido centrifugato ottenuto dalla emulsione vecchia (1).

Nella tavola I riporto, come esempio, il risultato di una di queste esperienze:

Tavola I.

Siero di coniglio immunizzato per sangue di bue	Sospesione recente di globuli di bue	Sospensione di globuli di bue tenuta per 12 giorni a 15°-20°	Globuli di sospensione vecchia lavati e sospesi in soluzione fisiologica nuova	Globuli freschi sospesi in centrifugato di sospensione vecchia	Risultato
cmc. 0.25	cmc. 1	—	—	—	emol. compl.
» »	—	cmc. 1	—	—	» medioc.
» »	—	—	cmc. 1	—	» compl.
» »	—	—	—	cmc. 1	» medioc.

I commenti sono facili: *il liquido centrifugato da emulsioni vecchie difende i globuli freschi; i globuli di sospensioni vecchie non hanno perduto la proprietà di lasciarsi sciogliere dalle emolisine.* Quindi, se si ammette che la sostanza che nel primo caso satura l'emolisina sia il recettore liberato dal globulo, si deve ammettere che di recettori ne rimangano poi ancora aderenti.

In successive ricerche ho potuto poi stabilire che queste sostanze capaci di saturare le emolisine si producono dagli eritrociti più abbondantemente se la sospensione di globuli in liquido indifferente è tenuta alla temperatura di 37°.

Ottenuti questi risultati con sieri di animale immunizzato, ho creduto utile verificare se in modo analogo si svolgessero dai globuli corpi capaci di saturare le emolisine naturali. A tale scopo ho ripetuto le esperienze servendomi di siero di cane e di globuli di bue, verso i quali, è noto, il siero di cane normale ha notevole azione emolitica. Come appare dalla ta-

(1) Naturalmente in questa come in tutte le altre esperienze le emulsioni vecchie erano riportate al volume primitivo con proporzionali aggiunte di acqua distillata, quando si fosse verificata un po' di evaporazione; essendo noto che il grado di concentrazione del cloruro sodico influisce sul processo emolitico.

vola II, che si trova più innanzi, perchè serve a dimostrare anche altri fatti di cui dirò in appresso, il risultato è stato positivo.

Mi parve, poi, opportuno studiare se questi prodotti, che si trovano nelle emulsioni vecchie di sangue, saturassero le emolisine in proporzione diretta della loro quantità, e se le emolisine presentassero per questi prodotti affinità maggiore o minore o uguale in confronto a quella che hanno per i corrispondenti globuli. Per risolvere la prima questione, in una serie di tubi contenenti una quantità costante di globuli rossi e di siero attivo ho aggiunto quantità progressive di liquido centrifugato da emulsioni di sangue vecchio. Per la seconda, ho messo a confronto i risultati che si ottengono facendo agire contemporaneamente determinate quantità di globuli, di siero attivo e di centrifugati, con quelli che si hanno tenendo prima a contatto i centrifugati col siero attivo per 2 ore a 37° e successivamente a questa miscela aggiungendo la quantità determinata di globuli rossi.

È evidente che se l'emolisina ha maggiore affinità per le sostanze contenute nel centrifugato che per i globuli, mescolando tutto contemporaneamente si dovrà avere una emolisi minore della metà di quella che si avrà mescolando il sangue dopo che il centrifugato abbia agito per due ore sulle emolisine; se invece l'affinità è maggiore tra i globuli e l'emolisina che tra questa e il centrifugato si avrà l'effetto contrario ; finalmente se l'affinità è uguale, nella miscela allestita contemporaneamente si avrà emolisi uguale alla metà di quella che si ottiene colle mescolanze successive.

Per determinare il diverso grado di emolisi che ottenevo nei singoli casi era necessario usare un metodo abbastanza esatto che mi permettesse di tradurre in numeri i risultati; e cioè dovevo o determinare la quantità di emoglobina che veniva sciolta o numerare i globuli che rimanevano integri. Mi sono attenuto a questo secondo metodo perchè il mio laboratorio non è fornito di un emoglobulinimetro sufficientemente esatto. Naturalmente tutte le miscele, in ogni singola esperienza, erano ridotte a volume uguale mediante aggiunta di soluzione fisiologica ; i globuli erano contati poi coll'apparecchio di Thoma-Zeiss, determinando la quantità di elementi che si trovavano in 1 mmc. di miscela.

Nelle seguenti Tav. II, III, IV, V sono riuniti i risultati di alcune di queste esperienze.

Tavola II.

Siero attivo di cane normale	Sospensione recente di eritrociti di bue	Liquido centrifugato da sospensione vecchia di eritrociti di bue Pochissimo emoglobinico	Liquido centrifugato da sospensione vecchia di eritrociti di bue Discretam. emoglobinico	Na. Cl. 0, 85 %	Eritrociti superstiti p r 1 mmc. di miscela
—	cmc. 1	—	—	cmc. 2.30	100. 000
cmc. 0.30	» 1	—	—	» 2	0
» 0.30	» 1	cmc. 0.50	—	» 1.50	5. 200
» 0.30	» 1	» 1	—	» 1	9. 320
» 0.30	» 1	» 2	—	—	18. 000
» 0,30	» 1	—	cmc. 0.50	cmc. 1.50	4. 000
» 0.30	» 1	—	» 1	» 1	7. 000
» 0.30	» 1	—	» 2	—	14. 640

Tavola III.

Siero attivo di cane normale	Liquido centrifugato da sospensione vecchia di eritrociti di bue Pochissimo emoglobinico	Liquido centrifugato da sospensione vecchia di eritrociti di bue Discretam. emoglobinico	Na. Cl. 0, 85 %	Sospensione recente di eritrociti di bue aggiunta dopo 2 ore	Eritrociti superstiti per 1 mmc. di miscela
cmc. 0.30	—	—	cmc. 2	cmc. 1	0
» 0.30	cmc. 0.50	—	» 1.50	» 1	14. 000
» 0.30	» 1	—	» 1	» 1	24. 000
» 0.30	» 2	—	—	» 1	44. 000
» 0.30	—	cmc. 0.50	cmc. 1.50	» 1	10. 000
» 030	—	» 1	» 1	» 1	18. 000
» 0.30	—	» 2	—	» 1	32. 000

Tavola IV.

Siero attivo di coniglio immunizzato per eritrociti di bue	Sospensione recente di eritrociti di bue	Liquido centrifugato da sospens. di eritrociti di bue tenuta per 10 giorni a 37° per altri 10 giorni a 20° Poco emoglobinico	Liquido centrifugato da sospens. di eritrociti di bue tenuta per 20 giorni a 20° Discret. emoglobinico	Na. Cl. 0. 85 %	Eritrociti superstiti pea 1 mmc. di miscela
—	cmc. 0.50	—	—	cmc. 1.50	70. 000
cmc. 0.10	» 0.50	—	—	» 1.40	0
» 0.10	» 0.50	cmc. 0.10	—	» 1 30	pochissimi
» 0.10	» 0.50	» 0.25	—	» 1.15	pochi
» 0.10	» 0.50	» 0.50	—	» 0.90	17. 500
» 0.10	» 0.50	» 1	—	» 0.40	32. 000
» 0.10	» 0.50	—	cmc. 0.10	« 1.30	pochissimi
» 0.10	» 0.50	—	» 0.25	» 1.15	pochi
» 0.10	» 0.50	—	» 0.50	» 0.90	12. 000
» 0.10	» 0.50	—	» 1	» 0.40	20. 000

Tavola V.

Siero attivo di coniglio immunizzato per eritrociti di bue	Liquido centrifugato da sospens. di eritrociti di bue tenuta per 10 giorni a 37° per altri 10 giorni a 20° Poco omoglobinico	Liquido centrifugato da sospens. di eritrociti di bue tenuta per 20 giorni a 20° Discret. emoglobinico	Na. Cl. 0, 85 %	Sospensione recente di eritrociti di bue aggiunta dopo 2 ore	Eritrociti superstiti per 1 mmc. di miscela
cmc. 0.10	—	—	cmc. 1.40	cmc. 0.50	0
» 0.10	cmc. 0.10	—	» 1.30	» 0.50	pochissimi
» 0.10	» 0.25	—	» 1.15	» 0.50	pochi
» 0.10	» 0.50	—	» 0.90	» 0.50	66. 600
» 0.10	» 1	—	» 0.40	» 0.50	70. 000
» 0.10	—	cmc. 0.10	» 1.30	» 0.50	pochissimi
» 0.10	—	» 0.25	» 1.15	» 0.50	pochi
» 0.10	—	» 0.50	» 0.90	» 0.50	63. 300
» 0.10	—	» 1	» 0.40	» 0.50	70. 000

Queste esperienze dimostrano che la quantità di emolisina che viene fissata dai liquidi centrifugati da emulsioni vecchie è direttamente proporzionale alla quantità di centrifugato che è aggiunta e che le emolisine hanno maggiore affinità per i globuli che per le sostanze contenute nei centrifugati. Infatti, confrontando i risultati delle tavole II e III, si vede che il numero di globuli che rimangono integri quando si mescolino contemporaneamente i centrifugati al siero e alla emulsione di globuli nuova, rimanendo costanti le altre condizioni, è sempre minore della metà di quello che si verifica quando i globuli siano aggiunti dopo che i centrifugati sono stati tenuti a contatto col siero per 2 ore a 37°. Ancor più evidente risulta il fenomeno se si confrontano i risultati delle tav. IV e V. Mentre 0.10 cmc. di siero, (quantità necessaria e sufficiente di siero per sciogliere tutti gli eritrociti contenuti in cmc. 0.5 di una emulsione di sangue di bue di cui 1 mmc. contiene circa 70.000 globuli) aggiunti alla emulsione assieme a 1 cmc. di centrifugato, ne sciolgono in un caso un po' più della metà in un altro circa 2[3; quando siano mescolati a 1[2 cmc. dello stesso centrifugato e dopo 2 ore di contatto a 37° siano aggiunti ad un 1[2 mmc. della stessa emulsione di globuli, non ne sciolgono più quasi affatto: su 70.000 globuli per mmc. ne rimangono integri 63.300 in un caso, 66.600 nell'altro.

Precedentemente ho accennato alla affermazione di Ide che il recettore del globulo rosso non sia altro che la sua emoglobina. Se le sostanze che nelle mie esperienze saturano l'emolisina sono i recettori degli eritrociti, l'ipotesi di Ide non è sostenibile, perchè i liquidi centrifugati da emulsioni vecchie, di cui io mi sono servito, contenevano quantità generalmente molto limitate di emoglobina. Di più nelle esperienze, di cui ho riportato i risultati nelle Tav. II a V, ho scelto di proposito dei centrifugati che contenevano pochissima emoglobina tra quelli che provenivano da emulsioni rimaste per qualche tempo a 37° e centrifugati discretamente emoglobinici tra quelli che erano sempre stati tenuti a temperatura più bassa (1), ed ho ottenuto che maggior quantità di emolisina è stata legata dai liquidi meno emoglobinici.

(1) Il contenuto emoglobinico delle sospensioni di globuli rossi tanto se tenute a 37° quanto se tenute a 15°-20° anche dopo molti giorni generalmente si mantiene basso, ma con differenze, in certi casi, molto spiccate.

Sarebbe interessante vedere se i centrifugati di emulsioni sanguigne vecchie, di cui ho studiato le proprietà sulle emolisine, hanno capacità di immunizzare, come teoricamente dovrebbe supporsi se si ammette che debbono le loro proprietà specifiche ai recettori.

È ciò che mi riprometto di studiare in seguito se mi sarà possibile ottenere dei centrifugati molto poveri di emoglobina e molto ricchi di sostanza attiva.

Intanto dalle esperienze sopra descritte si possono raccogliere le seguenti conclusioni:

È possibile ottenere *in vitro* dai globuli rossi delle sostanze capaci di saturare pure *in vitro* le emolisine.

Queste sostanze, che si comportano, sotto tale punto di vista, come quelle ottenute da batteri e considerate da Neisser e Shiga quali recettori liberi, si ottengono da sospensioni di sangue in soluzione fisiologica, più rapidamente alla temperatura di 37°. I liquidi centrifugati da queste sospensioni saturano l'emolisina in proporzione diretta della loro quantità.

Gli erotrociti dai quali si sono separati questi corpi conservano ancora la proprietà di essere attaccati dalle emolisine. Se tali corpi sono i recettori liberi, si deve ammettere quindi che i globuli contengano recettori in eccesso.

Le emolisine presentano maggiore affinità per i globuli che per queste sostanze.

Queste sostanze capaci di saturare l'emolisina non hanno rapporto diretto con la emoglobina, perchè la loro quantità è indipendente dal contenuto emoglobinico che possono presentare i liquidi che le hanno separate dagli eritrociti.